

**TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI  
FAKULTA TEXTILNÍ**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Liberec 2011**

**Vladislava Netroufalová**

# TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

## FAKULTA TEXTILNÍ



Studijní program: B3107 Textil  
Studijní obor: 3107R007 Textilní marketing

### PŘÍPRAVA CVIČENÍ V LABORATOŘI PRO PŘEDMĚT TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ A ZDRAVOTNICKÉ TEXTILIE

### THE LABORATORY EXERCISES PREPARATION FOR THE SUBJECT OF THE TISSUE ENGINEERING AND MEDICAL TEXTILES

Vladislava Netroufalová

KHT-799

**Vedoucí bakalářské práce:** Ing. Petr Mikeš

**Rozsah práce:**

Počet stran textu ...41

Počet obrázků .....40

Počet tabulek .....4

Počet grafů.....10

Počet stran příloh..1

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že předložená bakalářská práce je původní a zpracovala jsem ji samostatně. Prohlašuji, že citace použitých pramenů je úplná, že jsem v práci neporušila autorská práva (ve smyslu zákona č. 121/2000 Sb. O právu autorském a o právech souvisejících s právem autorským).

Souhlasím s umístěním bakalářské práce v Univerzitní knihovně TUL.

Byl/a jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 (školní dílo).

Beru na vědomí, že TUL má právo na uzavření licenční smlouvy o užití mé bakalářské práce a prohlašuji, že **s o u h l a s í m** s případným užitím mé bakalářské práce (prodej, zapůjčení apod.).

Jsem si vědoma toho, že užít své bakalářské práce či poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem TUL, která má právo ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, vynaložených univerzitou na vytvoření díla (až do jejich skutečné výše).

V Liberci dne 13.5.2011

.....

Podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Petru Mikešovi za poskytnutí informací, podkladů k bakalářské práci, Prof. RNDr. Davidu Lukášovi, CSc. za pomoc při zpracování a svým rodičům za podporu během celého studia.

## **ANOTACE**

Zadání bakalářské práce se vztahuje k tématům tkáňové inženýrství a zdravotnické textilie. Byla poskytnuta laboratorní cvičení v anglickém jazyce. Cvičení byla pro potřeby bakalářské práce a následně pro možnost uvedení předmětu pro české studenty přeložena do českého jazyka. Dále byla navržena přístrojová zařízení, která budou potřeba pro realizování daných laboratorních cvičení předmětu Tkáňové inženýrství a zdravotnické textilie. Nakonec byl vypracován průzkum mezi studenty Technické Univerzity v Liberci o oblasti informovanosti o tom, co zde mohou studovat, zda vědí, co se skrývá pod pojmem "tkáňové inženýrství" a zda je obor zajímavý. Konečným výstupem průzkumu jsou grafy reprezentující výsledky průzkumu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Tkáňové inženýrství, zdravotnické textilie

## **ANNOTATION**

The submission of the bachelors labour relates to the issues of tissue engineering and medical textiles . The laboratory handouts were provided in English . Then it was translated into Czech language for this thesis and for Czech students who will need it for their labours . After that the aparature which will be used for realizing the laboratory practise of the Tissue engineering and medical textiles were suggested . Finally was worked up the survey between the students of Technical University in Liberec about knowing of what they can study , if they know what is meant by "tissue engineering" and if they are interested in this field . The final outcome of the survey are graphs representing the results of the survey .

## **KEY WORDS**

Tissue engineering , medical textiles

## Obsah

Seznam použitých zkratk .....	8
Úvod .....	9
1. Rešerše.....	10
1.1 Tkáňové inženýrství .....	10
1.2 Textilie pro zdravotnictví .....	11
1.2.1 Požadavky na zdravotnické textilie .....	11
1.3 Neimplantační materiály.....	11
1.4 Implantační materiály .....	12
1.5 Prostředky pro hygienu a zdravotní péči .....	12
1.6 Mímotělní prostředky .....	12
1.7 Vlákná používaná ve zdravotnictví .....	13
1.8 Tkaniny .....	13
1.8.1 Základní vazby tkanin .....	13
1.8.2 Tkaniny ve zdravotnictví .....	13
1.8.3 Pletenotkaniny .....	13
1.9 Pleteniny ve zdravotnictví.....	13
1.10 Netkané textilie .....	14
1.11 Materiály používané ve zdravotnictví.....	15
1.11.1 Chirurgické nitě .....	15
1.11.2 Obvazové materiály.....	15
1.11.3 Obleky pro zdravotnický personál.....	16
1.11.4 Ortézy .....	16
1.11.5 Výrobky osobní hygieny s akviziční distribuční vrstvou.....	17
1.12 Umělé cévy a náhrady.....	18
1.13 Souvislost zdravotnických textilií s tkáňovým inženýrstvím.....	18
2. Podklady pro laboratorní cvičení k předmětu Tkáňové inženýrství a zdravotnické textilie .....	19
2.1 cvičení č. 1 .....	19
2.2 cvičení č.2.....	20
2.3 cvičení č.3.....	22
2.4 cvičení č.4.....	23
2.5 cvičení č.5.....	24
2.6 cvičení č.6.....	27
2.7 cvičení č.7 .....	31
2.8 cvičení č.8.....	32

2.9 cvičení č.9.....	34
3. Navržené přístrojové vybavení vhodné pro realizaci cvičení:.....	35
4. Současné zařízení laboratoře knt tul .....	37
5.Průzkum.....	41
5.1 Definování problému, účel výzkumu.....	41
5.2 Stanovení cíle výzkumu.....	42
5.3 Dotazník a jeho číselné a grafické vyhodnocení .....	42
5.4 Vyhodnocení dotazníku.....	47
6. Pojmy a definice .....	47
7. Závěr .....	48
8. Zdroje .....	48
9. Přílohy .....	50

## **SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

CCM (cell culture media ) – substrát kultivace buněk

FBS (fetal bovine serum) – plodové hovězí sérum

Ab (antibiotic ) - antibiotikum

Am (Antimicotic) - antimikotikum

PLGA-HA(poly(lactide-co-glycolide)-hydroxyapatit)-kopolymer kyseliny mléčné a glykolové

Mw (molecular weight ) – molekulová hmotnost

OGM (osteogenic mixture ) – osteogenická směs

BCA (bicinchoninic acid ) – bicinchoninická kyselina

WR (working reagent ) – pracovní činidlo

ALP (alkaline phosphatase ) – alkalická fosfatáza

DMEM(Dulbecco´s modified eagle medium )



## ÚVOD

Témata jako jsou tkáňové inženýrství a zdravotnické textilie jsou nejen velice důležité v současnosti, ale mají také obrovskou budoucnost. Vzhledem k tomu, že se ve světě objevují stále nové a nové nemoci, dá se předpokládat, že se vyvíjí i nové postupy k jejich léčbě. V minulosti si lidé nemohli koupit např. ani obyčejnou náplast, naopak v současné době se dají sehnat náplasti, které uvolňují postupně léčivou látku do rány, na kterou náplast dáme. Dokonce je již vyvinutá náplast, z níž se bude léčivá látka uvolňovat postupně podle toho, jak je již rána zhojená. Zezačátku více a postupně se množství bude snižovat. Dalším příkladem by mohlo být nahrazování kloubů. Mnoho lidí má problémy se svými klouby a proto jim často musí být vyměněny za kloub z porcelánu či jiné látky. Ale díky tkáňovému inženýrství se vyvíjí postup takový, aby kloub nemusel být vyměněn, ale jen by se do nohy vložily tzv. scaffoldy, které by kolenu pomohly se postupně zotavit. Bylo by možné uvést mnoho dalších příkladů, které by dokázaly, jak jsou zdravotnické textilie a tkáňové inženýrství pro zdraví člověka důležité.

Tato práce se zabývá nejdříve tématem zdravotnické textilie a tkáňové inženýrství a uvádí několik základních informací k těmto oborům a dále obsahuje několik cvičení pro plánovaný předmět Tkáňové inženýrství a zdravotnické textilie.

Nejdříve bylo potřeba přeložit podklady ke cvičením, které byly dodány k dispozici od vedoucího – Ing. Petra Mikeše. Podklady pro cvičení k předmětu Tkáňové inženýrství byly získány z Clemson University – Jižní Karolína, USA. Dále bylo potřeba určit přístrojové vybavení laboratoře, vhodné pro vykonávání laboratorních cvičení. Jelikož jsem studentkou Textilního marketingu, chtěla jsem také průzkumem a vytvořeným dotazníkem zjistit, jak jsou na tom studenti s informovaností o tkáňovém inženýrství a potažmo o předmětech nabízených Katedrou netkaných textilií. Na základě konečných vyhodnocení se dále katedra může rozhodnout, zda je třeba předměty více zviditelnit.

## 1. REŠERŠE

Následující kapitoly se budou zabývat teoretickou částí práce. Některé méně známé pojmy a definice jsou vysvětleny v kapitole 5. Pojmy a definice .

### 1.1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je multidisciplinárním oborem, který používá metody inženýrství a přírodních věd na vývoj biologických náhrad sloužících k obnově, zachování nebo zlepšení funkcí tkání. V současnosti můžeme zaznamenat rychlý pokrok zejména v oblasti výzkumu kmenových buněk, který vedl ke vzniku nového oboru nazvaného regenerativní medicína. Rozvoj tkáňového inženýrství byl podmíněn nedostatkem orgánů vhodných pro transplantaci. Dnes již přichází možnost vytváření tkání či celých orgánů z buněk na vhodném nosiči. Úspěchů již bylo dosaženo při vývoji chrupavky, kosti, kůže, šlachy, vazů, močové trubice či močového měchýře, tkáně pohlavních orgánů, ledviny, svalů, cév, rohovky, střeva, kloubů, ledviny, slinné žlázy i nervů. Proces transformace laboratorně připravené tkáně do praxe trvá zatím dlouho, můžeme mluvit o deseti- až dvacetileté prodlevě. Některé však již byly aplikované v medicíně.

Jedním z aktuálních témat současného tkáňového inženýrství je vývoj vhodných biokompatibilních nosičů a postupy pro přípravu tkání a orgánů. Biokompatibilní nosič je takový, který nijak neovlivňuje tkáň. Na výrobu nosičů se používají materiály přírodní, syntetické, nebo jejich kombinace. Přírodní materiály mají přirozená vazebná místa pro buňky. Problémem ale bývá přesná reprodukovatelnost jejich vlastností při opakované přípravě. Syntetické nosiče naopak mívají přesně definované složení a vlastnosti, které můžeme v průběhu přípravy ovlivňovat a měnit v souladu s požadavky konkrétní aplikace (např. na nosiče chrupavky jsou kladeny jiné požadavky než na nosiče pro přípravu rohovky nebo cév ). Velkou výhodou syntetických nosičů je možnost inkorporace látek ovlivňujících diferenciaci buněk a jiných substancí. Nosiče mívají nejrozumnější podobu . Může se jednat o gely, hydrogely, pěny, houby , tkané či netkané textilie. V poslední době nastupují na scénu i nosiče na bázi nanovláken. Pro zlepšení jejich vlastností je často použito mnoho výrobních postupů či materiálů. Mezi netextilní technologie patří vylučování solí ( rozpouštědla), rozdělování fází, formování taveniny, trojrozměrný tisk, sublimační sušení (lyofilizace), lyofilizace emulzí, plynové zpevňování či rychlé modelování. Široké uplatnění zde nacházejí i technologie textilní, mezi které se řadí

metoda pojení vláken, zvlákňování za mokra či elektrostatické zvlákňování, technologie výroby netkaných textilií, tkaní, pletení, vyšívání. Je důležité, aby nosič podporoval tvorbu nové tkáně a proto je na něj kladena celá řada požadavků. [2]

## 1.2 Textilie pro zdravotnictví

Použití textilií v medicíně využívá vlastností jako jsou pevnost, pružnost, poddajnost, tvarovatelnost, prodyšnost pro plyny, propustnost pro kapaliny. Pro medicínské aplikace je možno jednoduše dodávat speciální vlastností formou vazby aktivních látek ve vláknech nebo na povrchu textilie. Použití textilií ve zdravotnictví obsahuje širokou škálu, jako oděvní textilie pro nemocniční personál, ložní prádlo, chirurgické šicí nitě a obvazy přes bariérové textilie, složité kompozitní struktury pro náhradu lidských orgánů, kostí, či kůže. [2]

### 1.2.1 Požadavky na zdravotnické textilie

- Nejedovatost textilií a jejich produktů případného rozkladu
- Neschopnost vyvolávat alergické reakce respektive podporovat vznik maligního bujení buněk (rakovina)
- Možnost sterilizace bez zhoršení mechanických a jiných vlastností[2]

## 1.3 Neimplantační materiály

- obvazy (viz. obr.1)
- bandáže
- gáza
- vata
- absorpční vložky
- náplasti
- ortézy [2]



Obr. 1 : Obvaz

## 1.4 Implantační materiály

- chirurgické šicí nitě
- žilní transplantáty
- umělé klouby
- umělé kosti
- umělé vazy
- umělé artérie
- umělá kůže

Používají se jako náhrady částí lidského těla, spojovací materiály, náhrady šlach, chrupavek a kůže. Základním požadavkem na tyto materiály je jejich biokompatibilita. Pro zajištění prorůstání implantátů novou tkání je důležitá též jejich dostatečná porozita těchto materiálů.[2]

## 1.5 Prostředky pro hygienu a zdravotní péči

- roušky
- chirurgické oděvy (viz obr.2)
- medicínské uniformy
- závěsy
- lůžkoviny
- ochranné oděvy
- pomocné textilie aj. [2]



Obr. 2 : Jednorázový chirurgický oděv

## 1.6 Mimotělní prostředky

Jsou to mechanické orgány, které slouží k čištění krve.

- umělé ledviny
- umělá játra
- mechanické plíce [2]

## 1.7 Vlákná používaná ve zdravotnictví

Ve zdravotnictví jsou používána jak chemická, tak přírodní vlákna. [2]

## 1.8 Tkaniny

Tkaniny jsou jedním z možných použitých materiálů pro výrobu zdravotnických textilií. V následujících kapitolách budou uvedeny informace o vazbě, tkaninách ve zdravotnictví nebo pletenotkaninách.

### 1.8.1 Základní vazby tkanin

Správná volba vazby tkaniny vytváří nejen tkaninu jako takovou, ale dodává jí určité vlastnosti, jako je pevnost, vzhled, omak, tuhost a jiné. [2]

Ve zdravotnictví se mezi nejčastěji používané tkaniny řadí ty v plátnové vazbě.

### 1.8.2 Tkaniny ve zdravotnictví

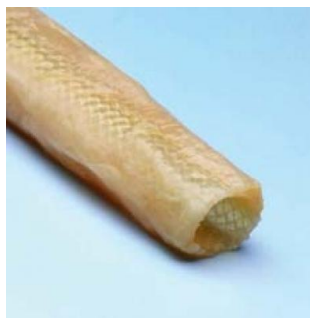
Tkaniny ve zdravotnictví jsou používány především na ložní soupravy, prostěradla, obleky pro zdravotnický personál a jiné. Pokud je na textilií kladen jiný požadavek, mohou být tkaniny různě upravovány například nešpinivou, vodoodpudivou, antistatickou či antibakteriální úpravou.[2]

### 1.8.3 Pletenotkaniny

Pletenotkaní, jak již z názvu vyplývá, je kombinací tkaní a pletení. Typické jsou proužky tkaniny spojené sloupky oček. Vlastnosti pletenotkanin jsou kombinací vlastností částečně pletenin i tkanin. Sortiment výrobků je široký, např. lůžkoviny, košiloviny, obvazové materiály s pevnými okraji a jiné. [2]

## 1.9 Pleteniny ve zdravotnictví

- cévní náhrady (viz. obr 3 )
- záplaty
- chirurgické síťky (viz. obr 4)
- síťky pro urologii



Obr.3 : Cévní náhrada

-kombinované obvazové textilie na popáleniny

-prádla pro onkologické pacienty či návlaky na amputované končetiny

Jednou z hlavních firem zabývajících se výrobou pletenin pro zdravotnictví je Výzkumný ústav pletařský v Brně. [2]



Obr.4 : Vícevrstvá částečně vstřebatelná síťka

## 1.10 Netkané textilie

Netkanou textilií je vrstva vyrobená z jednosměrně či náhodně orientovaných vláken, spojených třením, všíváním, plstěním, proplétáním a dalšími způsoby. Obecnou výrobu netkaných textilií by se dalo shrnout do pěti bodů, jimiž jsou: příprava vláknenných surovin, příprava vláknenných vrstev, zpevnění vláknenných vrstev, úpravy netkaných textilií a konečné zpracování netkaných textilií. Při výrobě netkaných textilií jsou používána jak přírodní, tak vlákna z přírodních či syntetických polymerů. Dále je možné zpracovávat i některé textilní odpady, druhotné suroviny a také vlákna speciální mezi které patří vlákna tvarovaná, bikomponentní, modifikovaná a jiné. Příprava vláknenné suroviny musí být přizpůsobena požadavkům na budoucí textilií např. ve formě stříže, dodávaná slisovaná v balících. Příprava vláknenných vrstev se dělí na dva způsoby. Suchý způsob může být prováděn aerodynamicky (spun-bond, melt-blown), přímo z polymeru, elektrostatickým zvlákňováním či mechanicky (podélné, příčné nebo kolmé vrstvení). Mokrý způsob může být proveden formou naplavování. Zpevnění vláknenných vrstev se provádí mechanicky, chemicky nebo termicky. K nejrozšířenějšímu způsobu mechanického zpevňování patří vpichování. Ve zdravotnictví tvoří velkou část výrobku pojených technologií spunlaced (pomocí paprsků vody). Po zpevnění se netkané textilie mohou spotřebitelům dodávat na rolích, často se ale dále upravují. Mohou se potiskovat, barvit, upravovat pomocí hydrofilní, hydrofobní, antistatické nebo nehořlavé úpravy.[2,3]

Firma MediCross, s.r.o. se specializuje na výrobu, prodej a distribuci jednorázových chirurgických a operačních materiálů. V příloze bakalářské práce na CD je vložen pro ukázkou katalog firmy z roku 2010.[4]

## **1.11 Materiály používané ve zdravotnictví**

Následující kapitoly se zabývají materiály používanými ve zdravotnictví, konkrétně v oblasti chirurgických nití, obvazových materiálů, obleků pro zdravotnický personál, ortéz či výrobků pro osobní hygienu.

### **1.11.1 Chirurgické nitě**

Chirurgické nitě jsou používány k uzavírání ran a řezů či k ošetření poškozené tkáně. V dnešní době je vyráběno velké množství druhů chirurgických nití. Jejich vlastnosti jsou dány použitím. K důležitým vlastnostem se dá zařadit pevnost, tvarová paměť, poddajnost, minimální savost, snášenlivost organismem a další. Historie chirurgických nití začala již ve starověku, ve starém Egyptě, cca 3000 let př. n.l.. Níť lze dělit dle různých hledisek, například dle vstřebatelnosti či původu materiálu. Vstřebatelné nitě se v organismu samy rozloží, nevstřebatelné musí být vyjmuty, nebo v organismu zůstanou. Je-li nit tvořena jedním vláknem, jedná se o monofil. Níť mohou být z přírodního nebo syntetického materiálu. U obou materiálů se níť dále dělí na vstřebatelné a nevstřebatelné. Přírodní nevstřebatelná je katgut. Název vznikl v roce 1599 a představoval v Murrayově slovníku název pro loutnovou strunu. Později byl katgut (catgut) sterilizován a představoval první skutečný šicí materiál. Mezi nevstřebatelné přírodní materiály se zařazuje hedvábí a len. Pro uchovávání nití se volí vhodné obaly, které dokážou zachovat sterilitu a umožňují vyjmutí a užití v antiseptických podmínkách. [2]

### **1.11.2 Obvazové materiály**

Obvazové materiály jsou většinou na bázi vláken, slouží k zastavení krvácení, aplikaci mastí, ke krytí ran a jiné. Dle funkce je dělíme na krycí, odsávací, tlakové, fixační, podpůrné, stahující, plastické a jiné. Dle materiálu je možné obvazy rozdělit na náplastové, šátkové, obinadlové či sádrové. Obvazy jsou vyhotovovány z různých materiálů a z důvodu styku s lidským tělem na ně jsou kladeny vysoké nároky. Materiály

pro jejich výrobu musí být netoxické, nealergické, nekarcinogenní, odolné vůči podmínkám sterilizace, musí být ekonomicky přijatelné a přiměřeně estetické. Ostatní materiály se odvíjí od účelu použití a funkce obvazu. Nejvíce se pro výrobu uplatňují přírodní materiály jako bavlna a celulóza nebo jejich směsi a používají se ve formě vaty, tkanin, pleteniny nebo netkaných textilií. Dále je možno použít syntetické materiály jako polyamid, polyester nebo je možno je směšovat s vlákny přírodními. Obvazy se pro použití musí také upravovat. Může jít o tepelnou stabilizaci, změnu velikosti ( např. nastříhání na gázu) nebo sterilizaci. Sterilizace se provádí buď fyzikálními prostředky , což může být např. vysoká teplota, nebo chemickými prostředky, kam bychom mohli zařadit peroxid vodíku a jiné. Takto sterilizovaný materiál se dále balí. [2]

### 1.11.3 Obleky pro zdravotnický personál

Např. na operačním sále, musí být lékař vhodně oblečen, jelikož je nutné zajistit co nejvyšší sterilitu prostředí. Textilie se dělí na ty pro jednorázové použití a pro opakované použití. Do skupiny pro jednorázové použití zařazujeme sterilní jednorázové oblečení pro operační sály, mezi textiliemi pro opakované použití zmíníme operační pláště nebo roušky. Tyto oděvy musí být trvanlivější, jelikož následně jsou pravidelně prány a sterilizovány. [2]



Obr 5.Dámský zdravotnický oděv

### 1.11.4 Ortézy

Slovo ortéza znamená v překladu z řeckého orthos rovný nebo správný tudíž vyplývá, že ortéza slouží k nápravě části těla do správného směru. Patří mezi zdravotní pomůcky, které vytváří podporu trupu nebo končetinám. Z hlediska konstrukce se téměř



vždy jedná o výrobek z více materiálů. Ortézy se dělí dle funkce na fixační , korekční , podpůrné a substituční. Dle způsobu výroby je můžeme dělit na individuální a sériové. Dle oblastí těla známe ortézy pro dolní končetiny, pro horní končetiny, trupové . Existuje mnoho dalších rozdělení, které zde nejsou uvedeny. Pro ortézy jsou důležité jejich mechanické vlastnosti, které zajišťují funkci ortézy a jejich komfort pro uživatele, proto vrchní vrstva ortéz, která je ve styku s kůží většinou již z textilního materiálu. [2]



Obr.6 : Kolenní ortéza

#### 1.11.5 Výrobky osobní hygieny s akviziční distribuční vrstvou

Do této skupiny patří dětské pleny, dámské vložky či vložky pro inkontinenční pacienty. Těmito výrobky se jednoznačně zjednodušil život spoustě lidí . [2]



Obr.7 : Dětské jednorázové pleny

## 1.12 Umělé cévy a náhrady

Pokud dojde k poškození tkáně, ne vždy je možné ji obnovit její funkci. Proto byly vyvinuty vhodné materiály, které jsou co nejpodobnější původnímu biologickému materiálu. V dnešní době se můžeme setkat s náhradami měkkých tkání, kam patří šlachy, vazy, kůže, kontaktní čočky, další jsou náhrady tvrdých tkání, jako jsou klouby, kosti a zuby a jako poslední zde zmíníme kardiovaskulární náhrady, kam se zařazují náhrady tepen, cév a chlopní. Ne všechny implantáty jsou konstruovány z textilních materiálů, ale právě náhrady cév se do nich řadí. [2]

Cévní chirurgie se začala rozvíjet na začátku 20. Století díky Dr. Charlesu Claude Guthrierovi a jeho pomocníkovi Alexis Carrelovi. Zabývali se spojováním cév, transplantací tkání i celých orgánů. Ideální náhrada by měla být pružná, zachovávající tvar při ohybu, trvanlivá, odolná proti biologickému a mechanickému působení a měla by být dostupná v mnoha velikostech a délkách. Měla by být odolná infekci a možná sterilizace bez jejího poškození. Důležitá je optimální porozita a nesmí způsobovat další poranění nebo reakce s krví či reagovat na vznik sraženin. Obrovský růst nastal v roce 1952 díky zavedení poddajných porózních textilních náhrad, Vinyon N. Pan Vooheerse se svým kolektivem zavedl do pravé srdeční komory psa hedvábnou nit a zjistil, že se časem potáhla lesknoucí se tenkou tkání bez sraženin. Díky tomu bylo vypořádováno, že pokud je náhrada vyrobena ze sítě podobné tkanině, dojde po zavedení k rychlému zastavení prosakování krve. Cévní náhrady jsou používány, pokud biologická céva přestane plnit svoji funkci a nelze ji uzdravit. [2]

## 1.13 Souvislost zdravotnických textilií s tkáňovým inženýrstvím

Jelikož se tato bakalářská práce věnuje jak zdravotnickým textiliím, tak i tkáňovému inženýrství, je nutno uvést, jak spolu tyto dva obory souvisí. Důležitým slovem je zde scaffold. Scaffold, jak je vysvětleno v kapitole 6(Pojmy a definice) je podpůrnou konstrukcí pro růst tkání a buněk. Základními podmínkami pro scaffoldy jsou biodegradabilita, tedy biologická vstřebatelnost, rychlost degradace, nesmí vyvolávat zánětlivé reakce a naopak musí napomáhat růstu tkáně. A proto je tu tkáňové inženýrství, které se zabývá např. i výrobou scaffoldů . Ty je možné vyrábět netextilními i textilními

technologemi. Skoro všechny textilní technologie umožňují vyrábět porézní vlákenné materiály. Proto jsou textilní technologie mnoho využívané k výrobě scaffoldů. Textilní materiály buňkám poskytují velký specifický povrch pro dobrou adhezi (srůst) buněk. Scaffoldy z textilií se začaly rozvíjet s rozvojem chemických vláken během 40.let minulého století. Textilní materiály jsou velice variabilní, proto lze vyrobit velké množství druhů textilií. A díky tomu jsou textilie vhodné právě i pro výrobu scaffoldů přesně podle požadavků pro konkrétní aplikaci. Tkaní jako nejrozšířenější technologie pro výrobu oděvů se již méně hodí pro výrobu scaffoldů pro svou menší tažnost a ohebnost. Pletení je pro jejich výrobu mnohem lepší technologií. Zátěžné pleteniny mají vysokou tažnost a jsou velmi poddajné, stlačitelné a prodyšné. Pomocí typu vazby je možno také upravit její vlastnosti. Netkané textilie, jako nejlevnější technologie výroby textilních výrobků mají vysokou porozitu pro dobré pronikání buněk do scaffoldu, velikost a povrch vláken, který podporuje dobrou adhezi buněk a jiné kladné mechanické vlastnosti. Proto jsou netkané textilie jednou z nejvyužívanějších technologií v tomto oboru.[2]

## **2. PODKLADY PRO LABORATORNÍ CVIČENÍ K PŘEDMĚTU TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ A ZDRAVOTNICKÉ TEXTILIE**

Zkratky používané v následujících kapitolách jsou vysvětleny v seznamu zkratk na začátku práce.

### **2.1 cvičení č. 1**

#### **KOSTNÍ PROJEKT**

#### **DIFERENCIACE KMENOVÝCH BUNĚK KOSTNÍ DŘENĚ DO OSTEOLASTŮ**

#### **Příprava substrátu kultivace buněk (CCM) a sítě buněk(v digestoři–chemický odsavač) :**

Buňky : kmenové buňky kostní dřene prasete

A . V 250 ml válci nebo kádince smíchejte 25 ml plodového hovězího séra (FBS) , 2,5 ml antibiotického/antimykotického roztoku a doplňte do 250 ml (celkové množství ) DMEM .

- Přefiltrujte směs pomocí sterilního filtračního systému. Označte nádobu : vaše jméno, datum, obsah (DMEM/10%FBS/1% Ab-Am).

B . Označte baňku T75 vaším jménem, datem, typem buněk (kmenové buňky kostní dřene prasete) a číslem . Do baňky T75 přidejte 10 ml CCM .

C . Z nádržky s tekutým dusíkem vyjměte kryogenní zkumavku obsahující 500 000 buněk v CCM. Nechte disperzi buněčného materiálu rozpustit pomocí krátkého opakovaného ponořování zkumavky do 37°C vodní lázně a poté přelijte obsah do baňky T75, která již obsahuje 10 ml CCM . [5]

## 2.2 cvičení č.2

### KOSTNÍ PROJEKT

#### DIFERENCIACE KMENOVÝCH BUNĚK KOSTNÍ DŘENĚ DO OSTEOLASTŮ

##### 1 . Příprava blány PLGA(kyselina glykolová) a PLGA – HA(hydroxyapatit) (v digestoři ) :

Polymer – keramická (PLGA – Hydroxyapatit ) tenká vrstva může být provedena táním polymeru v organickém rozpouštědle , poté se přidá požadovaná keramická forma částic. Rozpouštědlo se poté odpaří .

V 15 ml skleněné zkumavce :

- Rozpusťte 0,25 g PLGA (poměr laktid : glykolid = 50:50 , Mw = 50 000 ) v 1 ml dichlormethanu při stálém míchání a 800 ot/min na Vortex Genie 2.
- Přidejte 0,125 g částic HA (poměr PLGA : HA = 1:1) a rozptýlte třepáním na Vortexu .
- Pokryjte 10 chlazených skleněných krycích sklíček (ve skleněné Petriho misce) 100 µl kompozitní směsi a nechte v chemické digestoři k odstranění rozpouštědla .

Před očkováním buněk ( příští týden ) , sterilizujte folie umytím v 70% ethanolu po dobu 15 min , 2x ve sterilní vodě ( 15 min pokaždé ) , a UV po dobu 30 min .

2 . Buněčné subkultury – trypsinizujte a spočítejte použitím buněčného počítadla (Beckman-Coulter Z2 Particle Counter) – v digestoři :

- 1 . Odstraňte z baňky substrát .
- 2 . 1x omyjte pomocí 10 ml sterilního PBS (T75)
- 3 . Přidejte 3 ml Trypsin + EDTA , zajistěte , aby byla pokryta celá spodní část baňky .
- 4 . Odeberte 1 – 1,5 ml směsi Trypsin + EDTA .
- 5 . Umístěte baňky a trypsin do 37°C na 5 min .
- 6 . Zkoumejte pod mikroskopem a zjistěte , zda jsou buňky zaoblené a pohyblivé .
- 7 . Přidejte 10 ml sterilního DMEM k zamezení působení trypsinu
- 8 . Umístěte suspendované buňky do 15 ml centrifugační zkumavky .

- 9 . Roztočte při 1000 ot/min po dobu 5 min .
- 10 . Přidejte 10 ml čistého DMEM substrátu do každé nové T75 baňky .
- 11 . Odstraňte všechnu substrát až na 1 ml z rozmíchaných buněk .
- 12 . Přidejte čistý substrát (cca 1 ml) do centrifugační zkumavky do celkového množství 2 ml .
- 13 . Ponořujte buňky do substrátu pozvolným pipetováním nahoru a dolů .
- 14 . Odeberte 100  $\mu$ l buněčné suspenze a dodejte do 10 ml roztoku elektrolytu z Coulter Counter (počítadlo buněk) .
- 15 . Použijte počítadlo ( jak je popsáno níže ) ke spočítání buněk .
- 16 . Umístěte 500 000 buněk zpět do nové T75 baňky .

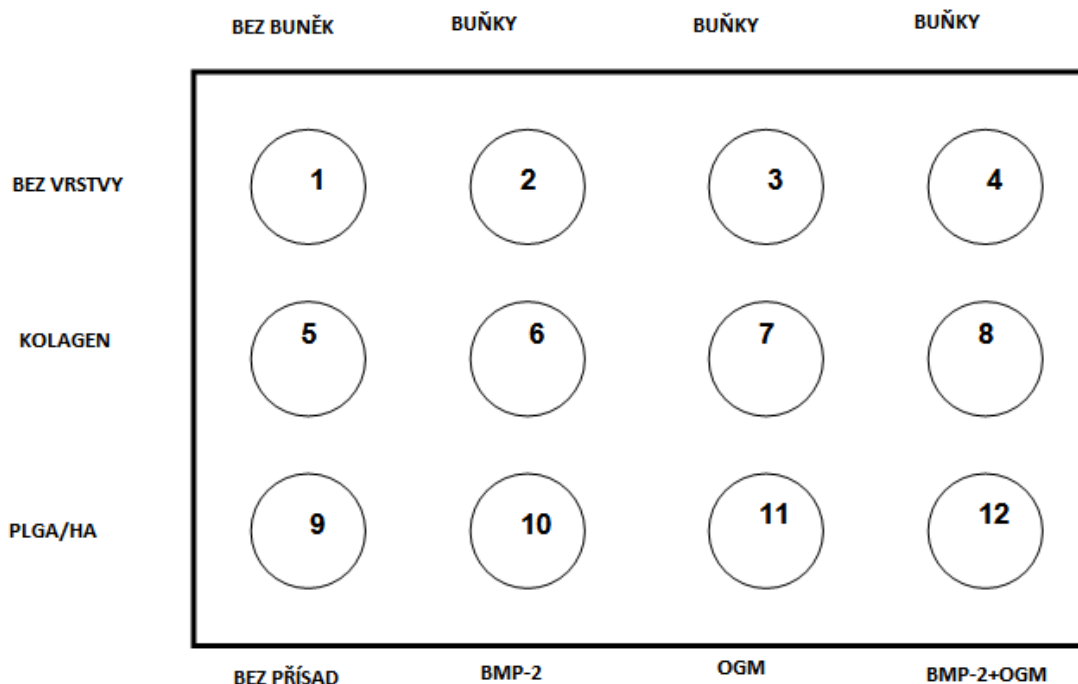
#### Počítadlo buněk :

- 1 . Zapněte tlačítkem Power on
- 2 . Odstraňte modrý čistící roztok a nahraďte roztokem elektrolytu .
- 3 . Stiskněte tlačítko "Function" - funkce  
"Prime Aperture" - primární světelnost  
"start"  
"start"
- 4 . Nechte přístroj jednou či dvakrát zkalibrovat ( pokud přístroj necháte běžet , bude kalibrovat 9x ) , poté stiskněte "stop"
- 5 . Umístěte roztok buňky/elektrolyt (z kroku 14 výše ) na držák .
- 6 . Stiskněte tlačítko "Set-up" k nastavení limitu velikosti buněk :  
"Upper size": 26  $\mu$ m  
"Lower size": 6  $\mu$ m  
"start"  
"start"
- 7 . Přístroj udá číslo , poté zmáčknete tlačítko "output" , a bude vám udáno množství buněk , které je obsahuje 1 ml substrátu .
- 8 . Nahraďte roztok buňky/elektrolyt modrým čistícím roztokem a znovu zkalibrujte přístroj jako v kroku 3 výše .
- 9 . Vypněte přístroj[5]

## 2.3 cvičení č.3

### KOSTNÍ PROJEKT

#### DIFERENCIACE KMENOVÝCH BUNĚK KOSTNÍ DŘENĚ DO OSTEOLASTŮ



Obr.8 : destička na umístění zkumavek

1 . Připravte kolagenové gely (vykonejte v digestoři) : Ze zkumavky obsahující 1 ml neutralizovaného kolagenu v roztoku (na ledu) pipetujte 100  $\mu$ l do jamek 5 – 8 do obou z vašich 12-ti jamkových destiček (jak je nakresleno na diagramu výše ) a umístěte destičky na 1 hodinu do inkubátoru (aby bylo možné gel polymerizovat) .

2 . Sterilizujte PLGA – HA blány (vykonejte v digestoři )-

Umyjte/ponořte krycí sklička obsahující PLGA-HA vrstvy 70% ethanolem na 15 min. Následně ethanol umyjte , 2x opláchněte krycí sklička sterilním PBS (15 min pokaždé ) , poté je nechte v digestoři se zapnutým UV světlem na 30 min . Vypněte UV světlo a umístěte sterilní krycí sklička do jamek 9 – 12 v každé s 12-ti jamkových destiček ( jak je zakresleno na diagramu výše ) s blánou PLGA-HA směrem vzhůru .

3 . Buněčná suspenze (proved'te v digestoři): Trypsinizujte a spočítejte vaše buňky tak, jak bylo provedeno minulý týden. Budete potřebovat konečný objem 2,2 ml substrátu

obsahující 2 miliony buněk (1000000 buněk/ml) . Nechte buňky ve 2 ml substrátu v 15 ml centrifugační zkumavce do dalšího kroku .

4 . Očkování buněk (proved'te v digestoři) : Napipetujte 100  $\mu$ l buněčné suspenze do prázdných jamek 2-4 , do jamek obsahujících kolagenový gel 6-8 , a do jamek obsahujících krycí sklíčka s PLGA-HA scaffold 10-12 (toto zapříčiní 100000 buněk/jamku) . Nechte buňky bez substrátu na 30 min v inkubátoru ( to umožní buňkám přilnout k podkladu substrátu/scaffoldu ) , poté opatrně přidejte 1 ml substrátu do každé jamky .

5 . Přidání osteogenních činitelů do buněk

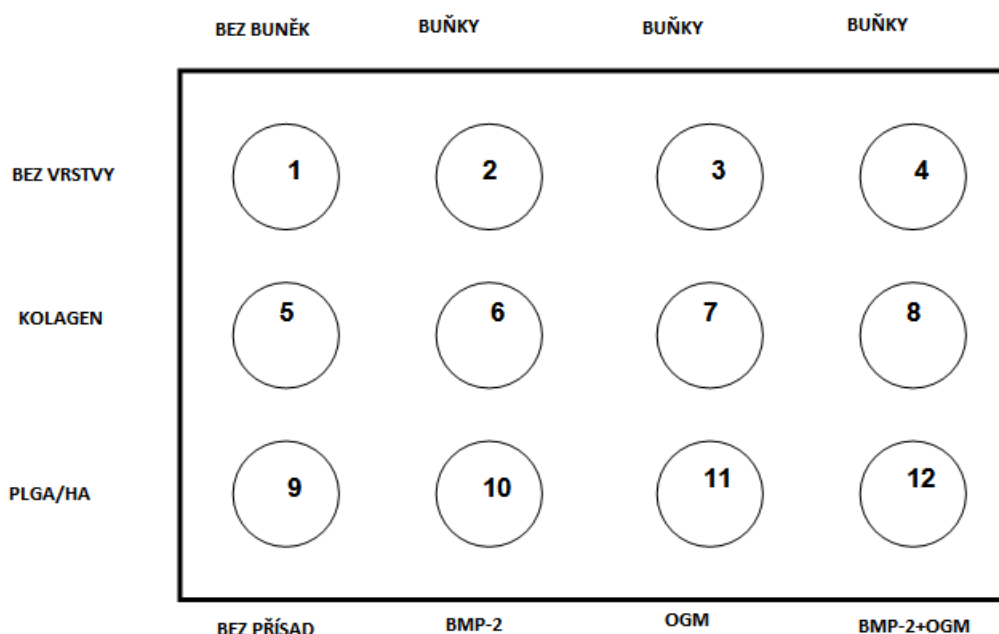
- Přidejte 100  $\mu$ l BMP-2 do jamek 2,6,10 a 4,8,12
- Přidejte 100  $\mu$ l osteogenní směsi(OGM) do jamek 3,7,11 a 4,8,12 (konečná koncentrace: dexametazon 0,1 mM , askorbát 2 –fosfát 50  $\mu$ M , beta-glycerofosfát 10 mM) . [5]

## 2.4 cvičení č.4

### KOSTNÍ PROJEKT

#### DIFERENCIACE KMENOVÝCH BUNĚK KOSTNÍ DŘENĚ DO OSTEOLASTŮ

-Vyměňte substrát a přidejte BMP-2 a OGM



Obr.9 : destička na umístění zkumavek

## CÉVNÍ PROJEKT

### Endothelializace cévního štěpu

1 . Připravte 200 ml solného roztoku (0,9 % NaCl)

Rozpusťte 1,8 g chloridu sodného v 200 ml vody.

2 . Připravte 100 ml decelularizovaného roztoku (nesterilní podmínky) 0,5% Triton , 0,1% EDTA , a 0,02% NaN<sub>3</sub> v 50 mM Tris tlumícího roztoku pH=7,5

a. Připravte 100 ml 50 mM Tris tlumícího roztoku

Rozpusťte 0,6 g Tris v 80 ml vody (M<sub>w</sub> pro Tris=121)

Upravte pH na 7,5 pomocí HCl

Doplňte objem do 100 ml vodou

b. Přidejte:

0,5 ml Triton X-100

0,1 g SDS-dodecylsulfát sodný

0,1 g EDTA – ethylen diamino tetraacetická kyselina, sodná sůl

0,02 g NaN<sub>3</sub>-dusičnan sodný

3 . Příprava scaffoldu

Očistěte 2 prasečí krční tepny v solném roztoku s ledem.

Obě tepny dejte do 50 ml zkumavky, přidejte 40 ml decelularizovaného roztoku .

Umístěte zkumavky do stojanu na třepačce na 3 dny, poté vyměňte roztok ve zkumavce a nechte do dalšího cvičení (max 1 týden).[5]

## 2.5 cvičení č.5

### CÉVNÍ PROJEKT

#### Pokračujte s přípravou scaffoldu

1. Zlikvidujte decelularizovaný roztok do odpadní nádoby.

2. Umyjte scaffoldy pomocí destilované vody 5x po dobu 10 min.

3. Rozpusťte 0,02 g NaN<sub>3</sub> ve 100 ml vody

4. Ponechte scaffold v 50 ml zkumavce s vodou+ NaN<sub>3</sub>(roztok 3) na třepačce.



## KOSTNÍ PROJEKT

### DIFERENCIACE KMENOVÝCH BUNĚK KOSTNÍ DŘENĚ DO OSTEOLASTŮ

#### 1. Zastavení kultivace buněk: Destička 1:

1. Vyjměte substrát kultivace buněk a opláchněte PBS.
2. Přidejte 1 ml studeného ustalovače (4% formaldehyd, 0,1% glutaraldehyd, 4% sacharóza připravené v hořečnanu vápenatém bez PBS).
3. Inkubujte buňky v tomto ustalovači na 20 min při pokojové teplotě.
4. 3x opatrně omyjte 1 ml PBS a dejte 1 ml PBS do každé jamky a nechte v chladničce do dalšího týdne (imunofluorescenčně se zbarví osteokalcin)

#### 2. Zastavení kultivace buněk : Destička 2:

1. Umyjte 1x jamky PBS.
2. Přidejte 300 µl roztoku buněčného lyzátu (‘‘M-PER’’-již připraveno)
3. Inkubujte po dobu 20 min při pokojové teplotě.
4. Během inkubační doby označte 12 mikrocentrifugačních zkumavek (jméno, číslo jamky)
5. Sesbírejte buněčné lyzáty do zkumavky (lyzát bude použit pro BCA a alkalické testy fosfatázy)
6. Pro příští týden budete potřebovat uchovat Destičky pro zbarvování scaffoldů (Alizarinová červen pro ukládání vápníku):
  - a. Opláchněte jamky 1x pomocí PBS, poté na 20 min přidejte 500 µl chladného methanolu
  - b. Odstraňte methanol a přidejte 500 µl PBS. Umístěte na týden destičku do chladničky

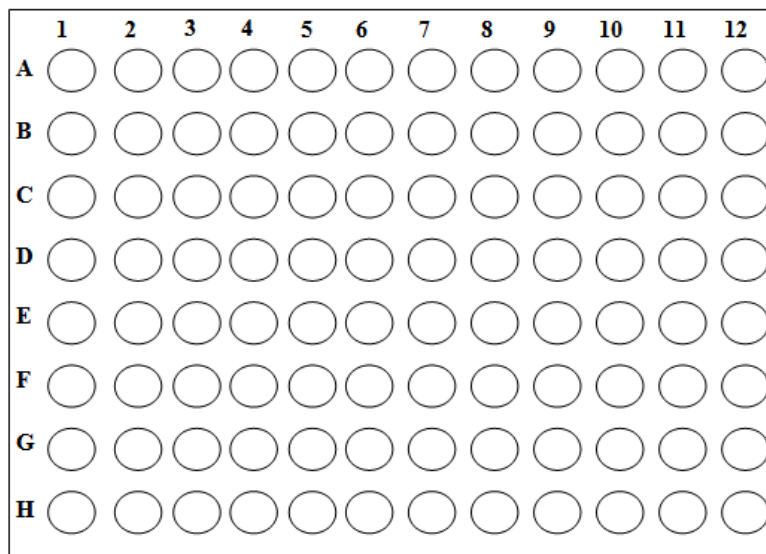
#### Celková koncentrace proteinů : BCA test na destičce 2

1. Připravte pracovní činidlo následně:
  - a. Smíchejte v 15 ml zkumavce 5 ml činidla A se 100 µl činidla B (poskytnuto)
2. Připravte následovně standardní křivku (buďte velice opatrní/přesní při pipetování těchto množství, na nichž může záviset výsledek vaší křivky):
  - Použijte standardní zásobní roztok z albuminu: 1 mg/ml (poskytnuto) připravte ředěním v 5 mikrocentrifugačních zkumavkách:

	zásobní roztok ( $\mu\text{l}$ )	voda ( $\mu\text{l}$ )	finální koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	A562	dA562
1	200	200	500		
2	100	300	250		
3	50	350	125		
4	25	375	62.5		
5	0	400	0		

3. Proved'te test BCA v 96 jamkové destičce následovně :

- Napipetujte 25  $\mu\text{l}$  každého vzorku do 5-ti jamek .
- Napipetujte 25  $\mu\text{l}$  každého vzorku(buněčné lyzáty) do 12-ti jamek
- Přidejte 200  $\mu\text{l}$  pracovního činidla do každé jamky
- Zakryjte a inkubujte na 30 min při 37°C
- Přečtěte absorbanci (562 nm)
- Zamrazte zbývající buněčné lyzáty pro alkalickou fosfatázu(ALP), test bude udělán později . Pomocí standardní křivky vypočítejte celkovou koncentraci proteinů ve vašich vzorcích .

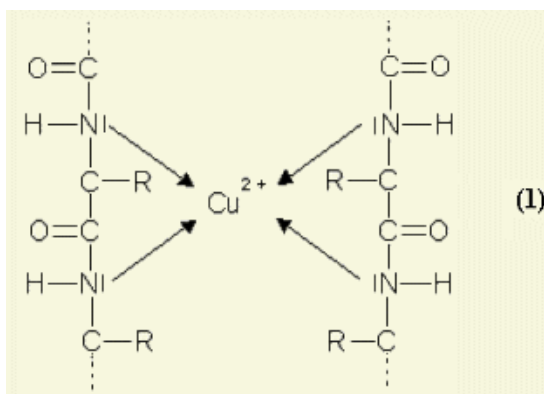


Obr.10 : destička na zkumavky

#### Princip metody:

BCA™ Proteinový test je detergent-kompatibilní formulaci založenou na kyselině bicinchoninové (BCA) pro kolorimetrickou detekci a kvantifikaci celkového množství bílkovin . Tato metoda kombinuje dobře známou redukci  $\text{Cu}^{+2}$   $\text{Cu}^{+1}$  bílkoviny

v alkalickém prostředí (biuretická reakce) s vysoce citlivou a selektivní kolorimetrickou detekcí kationu měďného ( $\text{Cu}^{+1}$ ) s použitím unikátního činidla obsahujícího kyselinu bicinchoninovou. (1) fialově zbarvený výsledek reakce tohoto testu je tvořen chelatací dvou molekul BCA s jedním iontem měďným. Tento ve vodě rozpustný komplex vykazuje silnou absorbanci při 562 nm, který je téměř lineární s rostoucí koncentrací bílkovin v širokém pracovním rozsahu (20-2000  $\mu\text{g/ml}$ ).  $\text{BCA}^{\text{TM}}$  metoda není skutečným konečným bodem metody, to znamená, že konečná barva se bude dále ještě vyvíjet. Nicméně po následné inkubaci, tempo pokračujícího vývoje barvy bude dostatečně pomalé, aby mohlo být stanovováno velké množství vzorků současně. [5]



Obr. 11 :Metoda BCA

## 2.6 cvičení č.6

### CÉVNÍ PROJEKT

Pokračování s přípravou scaffoldu

1. Zlikvidujte vodu s kyselinou do odpadní nádoby.
2. Ponechte scaffoldy v 50 ml zkumavce s 70% ethanolem na třepačce

### KOSTNÍ PROJEKT

#### A. Detekce osteokalcinu pomocí imunfluorescenčního barvení

Osteokalcin je protein nalezený v kostech a je vylučován osteoblasty.

#### Činidla (již připravená):

1. Chladné fixativum : Tento roztok je připraven z 4% formaldehydu, 0,1% glutaraldehydu, 4% sacharózy připravená v hořečnanu vápenatém bez PBS (využito během minulého cvičení).

2. Blokovací roztok : 2% BSA , 3% oslího séra a 0,1% Triton(X-100) připraveno v PBS
3. Primární protilátka : Mouse anti porcine osteokalcin rozřeďte na 4µg/ml .
4. Sekundární protilátka : AlexaFluor 488 Anti-Mouse IgG (protilátka)

Postup:

1. Přidejte 1 ml studeného ustalovače (řešení 1), inkubujte 20 min .
2. 3x opatrně omyjte pomocí 1 ml PBS  
-start zde-
3. blokujte na 15 min( nebo může být i přes noc) pomocí 2% BSA, 3% kozí sérum ,  
v PBS (řešení 2)
4. Opatrně 3x umyjte 1 ml PBS .
5. Přidejte 200 µl primární protilátky (řešení 3) do každé jamky a inkubujte při pokojové teplotě 45 min – 2 hod .  
(Během této doby , začněte s testem alkalické fosfatázy – viz následující strana)
- 6 . 3x opatrně umyjte 1 ml PBS
7. Inkubujte 1 hodinu nebo více s 200 µl sekundární protilátky(řešení 4) při pokojové teplotě, ve tmě!!!
8. 3x opatrně omyjte 1 ml PBS .
9. Vizualizujte pomocí fluorescenčního mikroskopu a snímejte reprezentativní snímky pomocí softwaru pro snímání.
- A. Test alkalické fosfatázy (použití buněčného lyzátu shromážděného minulý týden)  
Princip metody : kostní alkalická fosfatáza(B-ALP) , glykoprotein , nalezený na osteoblastech a je indikátorem (ukazatelem) kostní přeměny , urychluje hydrolýzu p-nitrofenylfosfát při pH=10,4 , uvolňuje p-nitrofenol a fosfát , dle následující reakce:  
$$\text{p-Nitrofenylfosfát} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{p-Nitrofenol} + \text{fosfát}$$
  
Míra p-nitrofenolu , který je fotometricky měřen , je úměrná koncentraci alkalické fosfatázy ve vzorku .

Činidla:

1. Substrát (S) :V 15 ml zkumavce rozpust'ete 1 tabletu p-Nitrofenolfosfátu ve 4 ml vody a poté přidejte 1 ml DEA(diethanolamin) a 20 µl roztoku MgCl<sub>2</sub>
2. P-nitrofenol zásobní roztok : 1 mg/ml (obdržíte připravené)
3. 2M NaOH ( dostanete připravené)

Standardní křivka: označte si 5 mikrocetrifugačních zkumavek a proved'te následující ředění p-Nitrofenolového zásobního roztoku:

	<b>p-NP(µl)</b> <b>ZÁSOBNÍ</b>	<b>voda (µl)</b>	<b>finální koncentrace</b> <b>(µg/ml)</b> <b>p-NP</b>	<b>A405</b>	<b>dA405</b>
1	200	200	500		
2	100	300	250		
3	50	350	125		
4	25	375	62.5		
5	0	400	0		

- Přidejte 25 ul NaOH do každé z 5-ti mikrocetrifugačních zkumavek .
- Napipetujte 225 µl z každé zkumavky na destičku .

Obsah:

1. Označte 13 mikrocetrifugačních zkumavek na vzorky 1-12 a 1 nepopsanou (bez enzymu)
2. Do všech 13-ti mikrocetrifugačních zkumavek , napipetujte 300 ul p-NPP substrátu(činidlo 1)
3. Přidejte 50 µl destilované vody do zkumavek vzorků 1- 12
4. Přidejte 50 µl vašeho buněčného lyzátu do zkumavek vzorků 1-12
5. Přidejte 100 µl M-PER do prázdné 13. Zkumavky (roztok použitý minulý týden pro lýzu buněk)
6. Inkubujte po dobu 30 min při 37°C
7. Zastavte reakci pomocí 25 µl NaOH
8. Pipetujte 225 µl z každé zkumavky do 13 dolíku na destičce
9. Zjistěte absorbanci při 405 nm .

Vypočítejte ALP konkrétní činnosti(SA) ,dle standardní křivky

Aktivita enzymu = moly substrátu na jednotku času

Specifická aktivita enzymu=aktivita enzymu na miligram celkového proteinu

SA= $\mu\text{mol S/mg protein/min}$ [5]

Zkumavky	A405	dA405	konc. pNP (ug/ml)
Standard 1			
Standard 2			
Standard 3			
Standard 4			
Standard 5			
Prázdná			
Lysate 1			
Lysate 2			
Lysate 3			
Lysate 4			
Lysate 5			
Lysate 6			
Lysate 7			
Lysate 8			
Lysate 9			
Lysate 10			
Lysate 11			
Lysate 12			

Konkrétní aktivita alkalické fosfatázy					
Vzorky	Celkový protein (mg/ml)	pNP (ug/ml)	pNP (umols/ml)	pNPP (umols S/ml)	konkrétní aktivita
číslo vzorku bun. lyzátu	(z křivky BCA)	(z křivky pNP)	Mw pNP=139 umols=ug/139	(same value as pNP umols)	$\mu\text{moles S/}$ <b>mg protein/30</b>
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					

## 2.7 cvičení č.7

### CÉVNÍ PROJEKT

Pokračujte s přípravou scaffoldu (v digestoři):

1. Umístěte 1 scaffold do 50 ml zkumavky, která obsahuje následující fixační činidla:  
30 mM EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid HCL)  
6 mM NHS (N-Hydroxysuccinimid)  
50 mM MES (Beta-Morfolino-metalsunfonser hydroxid) tlumící roztok
2. Nechte zkumavku na třepačce do příštího týdne .
3. Nechte další tepnu v EtOH , ale 3 uřízněte na 2-3 mm silné kroužky na extrakci DNA (příští týden).
4. Nechte obě zkumavky na okružní třepačce.

### KOSTNÍ PROJEKT

#### DIFERENCIACE KMENOVÝCH BUNĚK KOSTNÍ DŘENĚ DO OSTEOLASTŮ

##### A. Barvení alizarinovou červení pro vápník (destička 2)

###### I. Činidla (připravená)

- a. 1% roztok alizarinové červeně
- b. 1% roztok světle zelené

###### II. Postup barvení

- a. Opláchněte 2x destičku pomocí PBS.
- b. Přidejte roztok alizarinové červeně na 5-10 min
- c. Odstraňte přebytek barvy pomocí 5-6x výměny destilované vody
- d. Námačejte skvrnu ve světle zeleném roztoku na 8-10 sekund
- e. Ihned opláchněte zbytek světle zeleného roztoku
- f. Ponechte ve vodě
- g. Znázorněte a nafoťte

##### B. DiffQuick barvení buněk (destička 1)

- a. Opláchněte 3x destičku PBS
- b. Barvěte roztokem 1 (Eosin G) po dobu 10 sekund a osušte

- c. Odstraňte roztok 1
- d. Barvěte roztokem 1 (Thiazinové barvivo) po dobu 10 sekund a osušte
- e. Opláchněte 2x PBS
- f. Znázorněte a nafot'te[5]

## 2.8 cvičení č.8

### PROJEKT KARDIOVASKULÁRNÍHO TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ

#### A. Začátek kultivace prasečích endoteliálních buněk (pECs)

Příprava substrátu pro kultivaci buněk (v digestoři):

1. V 250 ml válci nebo kádince smíchejte 25 ml plodového hovězího mízního moku(FBS), 2,5 ml antibiotického/antimykotického roztoku a doplňte do 250 ml (celkové množství) MCDB-131
2. Přefiltrujte směs pomocí sterilního filtračního systému. Označte nádobu: vaše jméno , datum , obsah (MCDB-131/10% fbs/1% Ab-Am). Toto je váš kultivační substrát .
3. Označte T75 baňku vašim jménem , datem , typem buněk (prasečí endoteliální buňky) a číslem cvičení . Dejte 10 ml z kultivačního substrátu do baňky T75.
4. Pouze pokud vaše T75 baňka obsahuje kultivační substrát, vyjměte kryogenní zkumavku , obsahující pECs z hlubokomrazícího boxu(-80°C). Nechte buňky rozmrazit krátkým a opakovaným ponořováním zkumavky v 37°C vodní lázni a poté přemístěte obsah do baňky T75.
5. Umístěte baňky T75 do inkubátoru a zajistěte, aby váš substrát byl obměňován každé 2-3 dny.

#### B. Mechanická charakteristika EDC/NHS vázaných scaffoldů vs. nevázaných ovládacích prvků (pouze pozorování) :

#### C. Jednoosé tahové zkoušky

- 1 . 2 vzorky nakrájíme na činky/tvar psí kosti v podélném směru scaffoldů
- 2 . Tloušťka a šířka vzorku bude měřena pomocí digitálního posuvného měřítka .
- 3 . Vzorky testujte při konstantní rychlosti 12,5 mm/min (použijte MTS Synergie 100 testovací rám se zatížením 10 N )

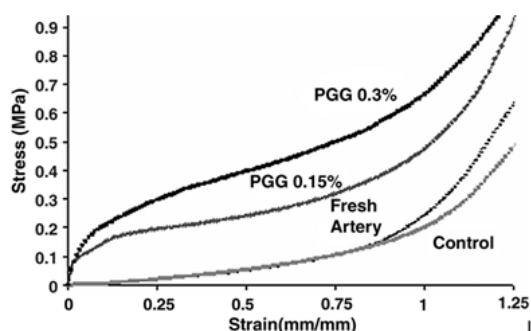


4 . Deformační napětí křivky může být zjištěno ze zatížení nebo posunutím dat zaznamenaných počítačem: tlak: rozdělte zatížení plochou příčného řezu preparátu (šířka vs. Výška ), napětí :vypočtením změn v délce (prodloužení) oddělením z původní délky vzorku – vypočteno jako délka mezi sevřením( $L_f - L_o$ )/ $L_o$

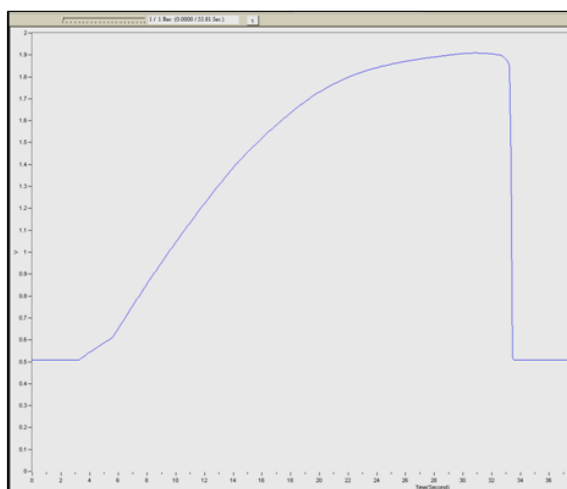
Testování prasknutí:

- 1 . Nastavení testu vyžaduje , aby peristaltická pumpa a tlakový snímač byly připojeny k počítači pomocí univerzální sériové sběrnice – data s rozhraním – aktivizační modul
- 2 . Duté scaffoldy (n=4, 2-EDC/NHS upevněné a 2 neupevněné) budou připojena pomocí plastových příchytů na polyethylenové konektory
- 3 . Tlak vzniká v rámci scaffoldů postupným zvyšováním rychlosti peristaltické pumpy , která bude posunovat solný roztok do nádoby
- 4 . Výstupy signálu napětí budou zaznamenávány a převáděny na jednotky mmHg
- 5 . Tlak při roztržení bude zaznamenán , jakmile bude zpozorován náhlý pokles tlaku .

Zaznamenání příkladu křivky napětí-deformace a tlaku při prasknutí.[5]



Obr.12:křivka napětí-deformace



Obr. 13 :křivka tlaku při prasknutí

## 2.9 cvičení č.9

DNES BUDE VŠE STERILNÍ!!!!!!

Endotelializace cévního štěpu

Decelularizované , čerstvé a EDC/NHS upravené scaffoldy byly přes noc uchovány v substrátu buněčné kultivace obsahující 50% FBS (pro povrchovou úpravu absorpce bílkovinných proteinů- povrchy přívětivé k buňkám ) .

Pro endoteliální očkování buněk : viz obrázek na další straně

(Návody jsou též postavené v digestoři)

1. Upravte štěpy na velikost použité gumové šablony (k dispozici)
2. Najděte ostnaté/Luerovy spojky , které pohodlně padnou do každého konce štěpu ( k dispozici 6 velikostí )
3. Zabezpečte spojky pomocí svazkování kabelů po obou stranách , přebytek odřízněte

\*Zatím si připravte buňky-trypsinizujte , nechte vířit , resuspendujte ve 4 ml , spočítejte

4 . Nasajte buněčnou suspenzi do sterilní stříkačky , připojte na 1 konec (1/2 otáčky)

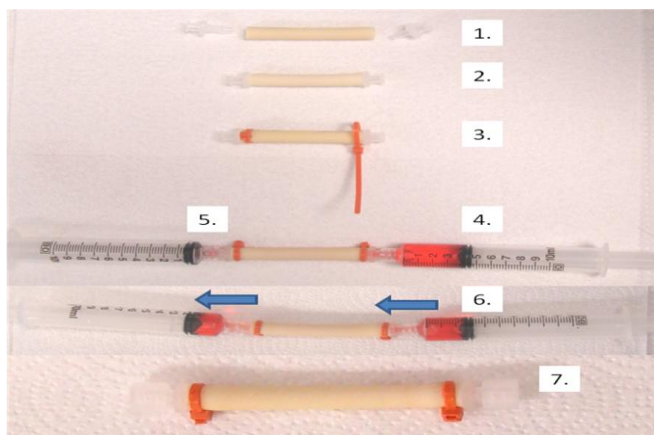
5 . Připojte druhou stříkačku (prázdná)

6 . Pomalu tlačte buněčnou suspenzi dokud zcela nenaplní štěp (natažení prázdné stříkačky Vám může pomoci)

7 . Odstraňte 1. Stříkačku a konec uzavřete . Poté uzavřete i druhý konec .

8 . Umístěte do 2 sterilních 50 ml zkumavek . Přidejte 30 ml substrátu .

9 . Inkubujte při 37°C do dalšího týdne , zatímco 5 zkumavek (3 upevněné , 2 volné) bude nainstalováno v bioreaktoru .[5]



Obr.14 :postup očkování buněk

### 3. NAVRŽENÉ PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ VHODNÉ PRO REALIZACI CVIČENÍ:

-buněčná digestoř (za 88 360 Kč je možné sehnat Stolní digestoř AIRONE GS-800 na adrese [www.p-lab.cz](http://www.p-lab.cz))



Obr. 15: buněčná digestoř AIRONE GS-800

-Vortex Genie 2 (možnost zakoupit za 7 812 Kč na internetové adrese [www.p-lab.cz](http://www.p-lab.cz))



-počítadlo buněk (dostupný je např. Beckman Coulter Z2 na [www.gmi-inc.com](http://www.gmi-inc.com))

Obr.16: Vortex genie 2



Obr.17: počítadlo buněk Beckman Coulter Z2

-mikroskop

-inkubátor (na [www.p-lab.cz](http://www.p-lab.cz) možno za 67 470 Kč sehnat Inkubační skříň TH 15)



Obr. 18: Inkubační skříň TH 15

-centrifuga-třepačka (na [www.p-lab.cz](http://www.p-lab.cz) je možné sehnat přístroj Centrifuga Sigma 2-6 za 57 150 Kč nebo Mikrocentrifuga Eppendorf 5418 za 35 900 Kč)



Obr. 19: Centrifuga sigma 2-6C



Obr. 20: Mikrocentrifuga Eppendorf

-hluboko mrazící box (na [www.trigon-plus.cz](http://www.trigon-plus.cz) je možné sehnat box HERAfreeze)



Obr. 21: hlubokomrazící box HERAfreeze

-MTS Synergie 100 testovací rám

-počítač

-snímač tlaku

-peristaltická pumpa (také na [www.p-lab.cz](http://www.p-lab.cz) za 48 048 Kč

Ecoline Ismatec)



Obr. 22: peristaltická pumpa Ecoline Ismatec

## 4. SOUČASNÉ ZAŘÍZENÍ LABORATOŘE KNT TUL

-vybavení laboratoře bylo nafoceno. Fotografie je možné shlédnout i na přiloženém CD.



Obr. 23:laboratoř



Obr. 24:laboratoř



Obr. 25:laboratoř



Obr. 26:laboratorní pipeta





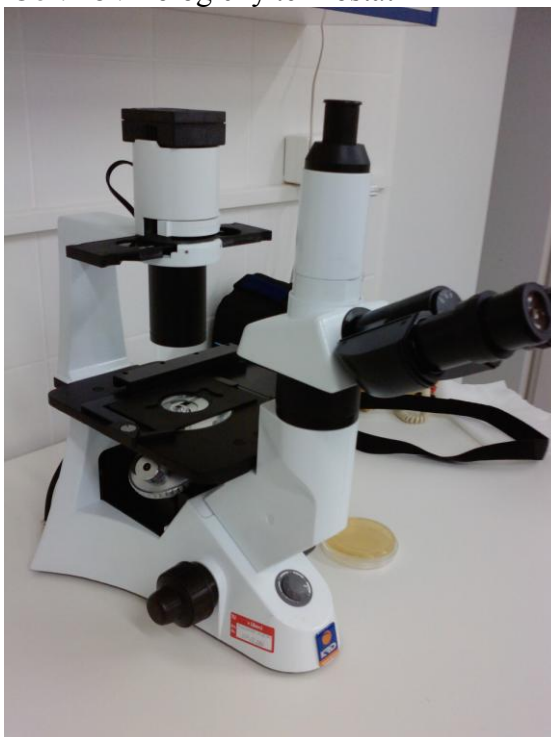
Obr. 27: Telstar bio II A



Obr. 28 : Biologický termostat



Obr. 29: centrifuga



Obr. 30: mikroskop



Obr. 31: Spektrofotometr



Obr. 32: Hlubokomrazicí box



Obr. 33: Stolní inkubátor



Obr. 34: rotátor



Obr. 35: Vortex mixer



Obr. 36: Míchadlo se zahřívacem



Obr. 37: Pipeta



Obr 38: Laboratorní váhy





Obr. 39: Rotační reometr



Obr. 40: čistič vzduchu

## 5. PRŮZKUM

Důležitým bodem této práce je též průzkum mezi absolventy, současnými i budoucími potencionálními studenty TUL. Pro katedru netkaných textilií, která se chystá začít vyučovat předmět Tkáňové inženýrství a zdravotnické textilie je důležité vědět, zda mají studenti o tento obor zájem, zda mají dostatek informací a jestli o informace stojí, popřípadě jakou formou by si představovali informace z této oblasti získat. Dále je možné zjistit o jaké předměty z katedry je největší a o jaké nejmenší zájem.

### 5.1 Definování problému, účel výzkumu

Účelem výzkumu je zjistit, zda studenti tuší, co obsahuje oblast tkáňového inženýrství a jaké možnosti studia mají na FT – KNT. Výzkum je prováděn pro potřeby FT, která na

základě vyhodnocení dotazníku zváží, jaké kroky je nutno udělat pro to, aby studenti získali více informací v této oblasti.

## 5.2 Stanovení cíle výzkumu

Výzkum sloužil pouze pro účely této bakalářské práce a dále budou k dispozici katedře netkaných textilií, která rozhodne, zda je s výsledky spokojená či nikoliv. Pokud spokojená nebude, tak vyhodnotí, co by bylo třeba udělat pro to, aby se výsledky změnily. Metodologický výzkum - fenomenologický – pouze subjektivní názory respondentů, výzkum byl jednorázový, pro účely bakalářské práce. Respondenti jsou současní nebo bývalí studenti TUL, většina z nich k textilní fakulty. Dalšími respondenty jsou budoucí potencionální studenti TUL. Data se sbírala dotazováním písemným a elektronickým. Dotazník je částečně striktně formulovaný, částečně volný. Odpovídalo celkem 76 respondentů.

## 5.3 Dotazník a jeho číselné a grafické vyhodnocení

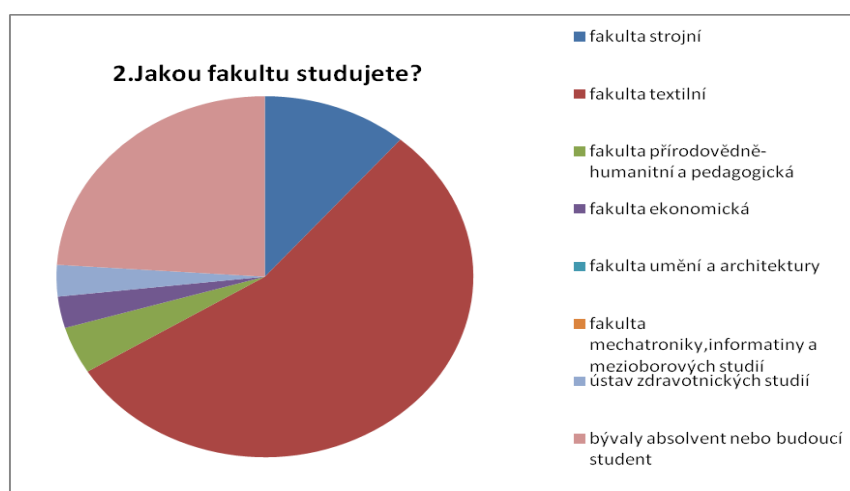
### 1. Uveďte Vaše pohlaví

- |        |    |
|--------|----|
| - Muž  | 24 |
| - Žena | 52 |



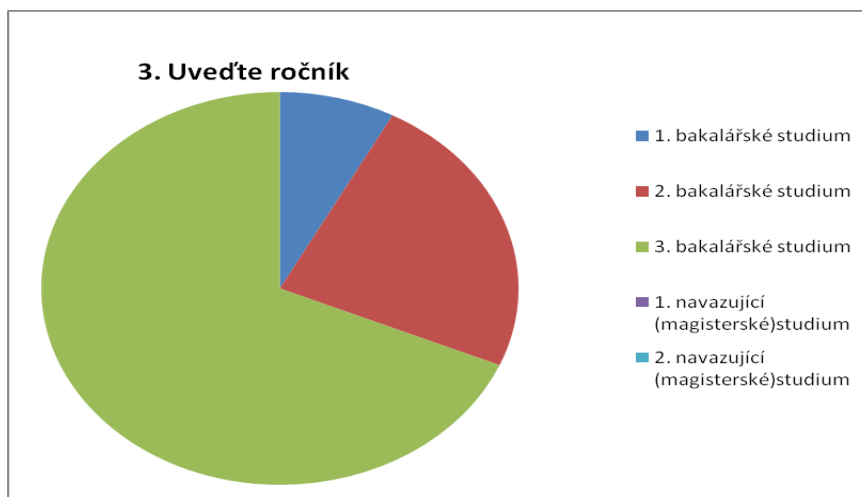
2. Jakou fakultu studujete?

- Fakulta strojní	8
- Fakulta textilní	39
- Fakulta přírodovědně – humanitní a pedagogická	3
- Fakulta ekonomická	2
- Fakulta umění a architektury	0
- Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií	0
- Ústav zdravotnických studií	2
- Bývalý absolvent nebo budoucí student	17



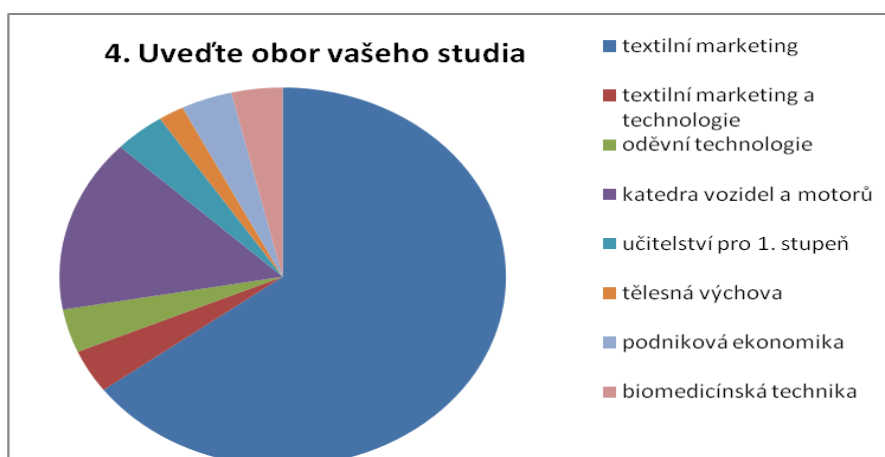
3. Uveďte ročník:

- 1. bakalářské studium	4
- 2. bakalářské studium	12
- 3. bakalářské studium	35
- 1. navazující (magisterské) studium	3
- 2. navazující (magisterské) studium	0



4. Obor:

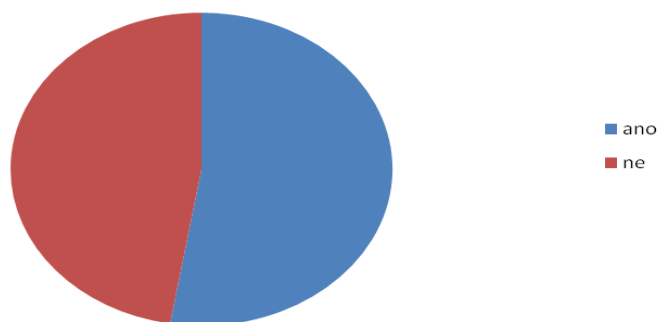
- textilní marketing	35
- textilní marketing a technologie	2
- oděvní technologie	2
- katedra vozidel a motorů	8
- učitelství pro 1.stupeň	2
- tělesná výchova	1
- podnikové ekonomika	2
- biomedicínská technika	2



5. Víte , čím se zabývá tkáňové inženýrství?

-ano	40
-ne	36

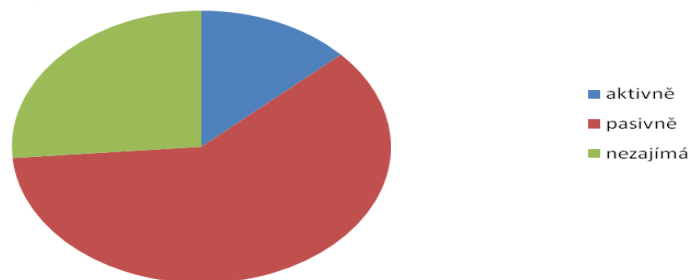
**5. Víte, čím se zabývá tkáňové inženýrství?**



**6. Zajímá Vás tento obor?**

-aktivně (rád/a bych se jím hlouběji zabýval/a)	10
-pasivně (pouze bych rád/a získal/a informace)	46
-nezajímá	20

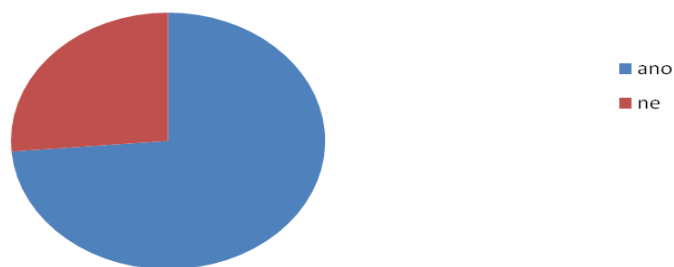
**6. Zajímá Vás tento obor?**



**7. Získal /a by jste rád/a informace?**

-ano	56
-ne	20

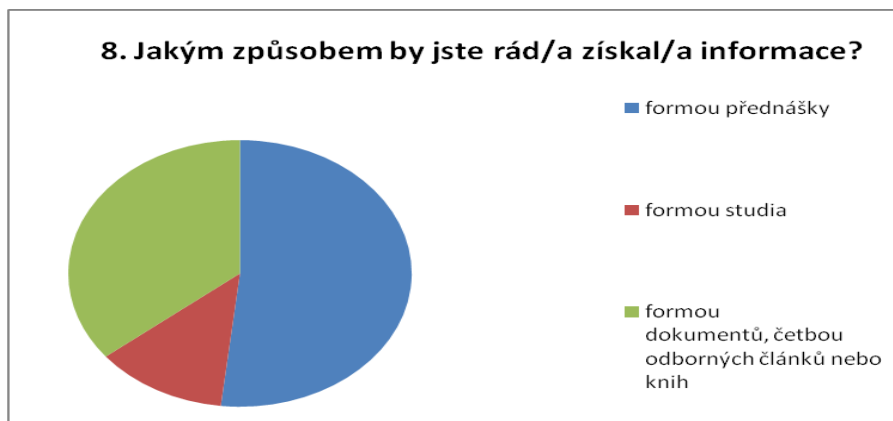
**7. Získal/a by jste rád/a informace?**



**8. Jakým způsobem by jste rád/a získal/a informace?**

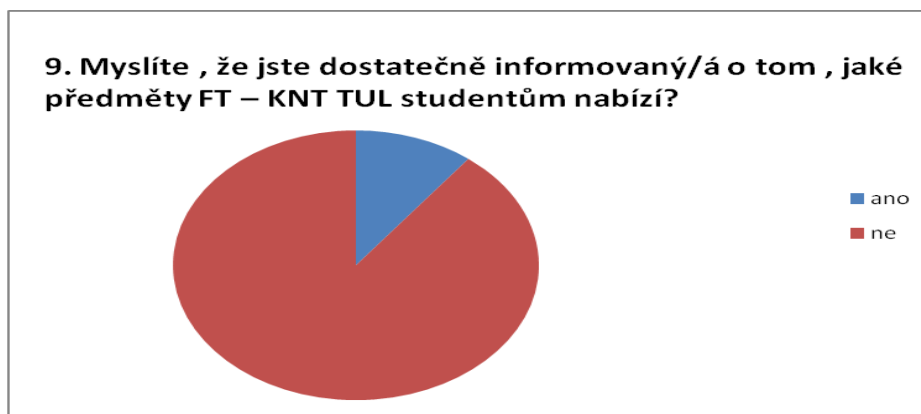
-formou přednášky	29
-formou studia	7

-formou dokumentů, četbou odborných článků nebo knih 20



9. Myslíte , že jste dostatečně informovaný/á o tom , jaké předměty FT – KNT TUL studentům nabízí?

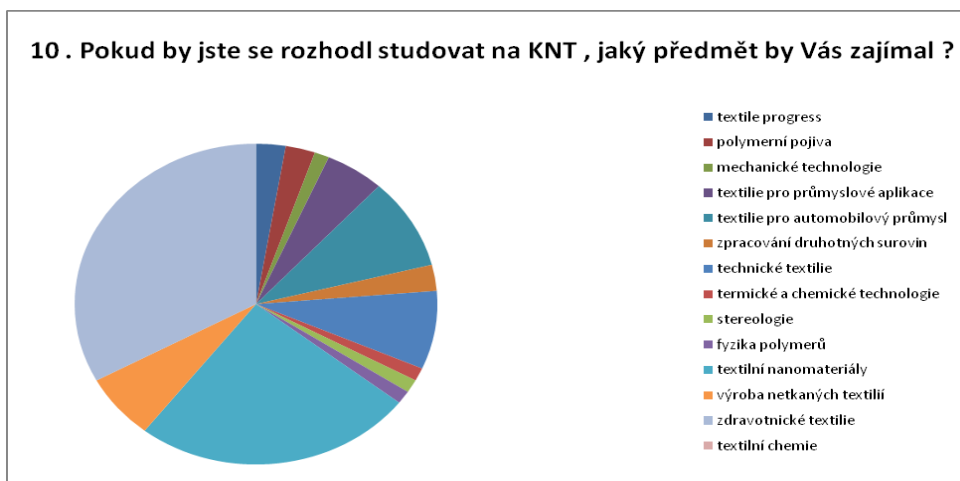
- ano 8  
- ne 68



10. Pokud by jste se rozhodl studovat na KNT , jaký předmět by Vás zajímal ?

-textile progress	2
-polymerní pojiva	2
-mechanické technologie	1
-textilie pro průmyslové aplikace	4
-textilie pro automobilový průmysl	7
-zpracování druhotných surovin	2
-technické textilie	6
-termické a chemické technologie	1
-stereologie	1
-fyzika polymerů	1
-textilní nanomateriály	19

-výroba netkaných textilií	5
-zdravotnické textilie	25
-textilní chemie	0



## 5.4 Vyhodnocení dotazníku

Z průzkumu vychází, že by se katedra měla věnovat větší reklamě svých předmětů, mohla by například pořádat přednášky, besedy a více komunikovat se studenty z jiných fakult , či oborů, ale i s širokou veřejností, která se jistě dozví více o tom, co zde studenti studují a čím mohou být po absolvování přínosem naší společnosti.

## 6. POJMY A DEFINICE

Biokompatibilita = snášenlivost látek v biologickém prostředí

Biodegradabilita vláken = vlákno se v těle dokáže vstřebat , či rozložit

Celulizace = výskyt a nahromadění buněk v určité oblasti, buněčnost

Degradace = přeměna složitější sloučeniny v jednodušší

Diferenciace = proces vyžrávání, rozlišování, během něhož jednotlivé buňky, tkáně a části

Endothelializace = pokrytí endotelem. E. umělých chlopní – bioprotéz zamezuje vzniku trombózy

Chelatace = fyzikálně chemický proces, při němž některé organické sloučeniny váží více vazebné kationty obzvlášť kovy – železo, měď, vápník atd. dvěma nebo více vazbami.

Inkorporace = začlenění, zabudování organismu získávají specializované vlastnosti a funkce

Kostní dřev = tkáň uvnitř kosti v dřevné dutině

Kmenová buňka = buňka, z níž teprve dalším dělením a diferenciací vznikají zralé buňky plnící určitou funkci

Lyofilizace = sušení za mrazu

Osteoblast = aktivní kostní buňka tvořící osteoid(nemineralizovaná kostní tkáň), základní kostní hmotu

Osteokalcin = kostní bílkovina, představující po kolagenu I nejhojnější bílkovinu kosti. Je produkován osteoblasty

Trypsin = trávicí enzym

Scaffold = z angličtiny "lešení, konstrukce, skelet" pomáhá růst buňkám a celým tkáním

## 7. ZÁVĚR

Závěrem této práce bych se vrátila k účelu a postupu této práce a popsala několik výsledků, které by se měly vzít na vědomí. Účelem této práce bylo zpracovat podklady, které byly získány na jiné univerzitě k tomu, aby se mohl začít provozovat nový předmět, který by se zabýval tkáňový inženýrstvím a zdravotnickými textiliemi. Vzhledem k tomu, že podklady ke cvičením obsahovaly i přístrojové vybavení, potřebné k realizaci daných cvičení, bylo třeba dané přístroje sepsat. Přístroje, které obsahuje v současné době laboratoř pro tento předmět, jsou v práci vloženy ve formě fotografií. Dále byl proveden průzkum, který se zabýval tím, zda studenti tuší, čím se zabývá obor tkáňové inženýrství, zda by rádi informace získali a případně jakou formou. Dále bylo zjišťováno, o jaký předmět z KNT by měli zájem, pokud by se zde rozhodli studovat. Jelikož má tento obor velkou budoucnost v praxi a konkrétně ve zdravotnictví, které bude důležité neustále, je velmi pravděpodobné, že studenti budou chtít obor poznávat, studovat a rozvíjet se.

## 8. ZDROJE

- [1] *Velký lékařský slovník online* [online]. 2008-2011 [cit. 2011-05-11]. Velký lékařský slovník. Dostupné z WWW: <lekarske.slovníky.cz>.



- [2] Lukáš D. , Lékařské textilie , Asociace inovačního podnikání ČR , Praha , 2008
- [3] Dostálová M. , Křivánková M. , Základy textilní a oděvní výroby , Liberec , 2001
- [4] *Moramedica* [online]. 2011 [cit. 2011-05-11]. Spotřební materiál MediCross.  
Dostupné z WWW: <[www.moramedica.cz](http://www.moramedica.cz)>.
- [5] Simonescu , Tissue engineering and Cell biology
- [Obr.1] *Invaz s.r.o. Kocléřov* [online]. 2008 [cit. 2011-05-11]. Zdravotnický materiál.  
Dostupné z WWW: <[www.invaz.cz](http://www.invaz.cz)>.
- [Obr.2] *První chráněná dílna* [online]. 2008-2010 [cit. 2011-05-11]. Zdravotní oděvy.  
Dostupné z WWW: <[www.prvnichranenadilna.cz](http://www.prvnichranenadilna.cz)>.
- [Obr.3] *DAHLHAUSEN CZ intenzivní péče* [online]. 2008 [cit. 2011-05-11].  
Cévní náhrada Omniflow II. Dostupné z WWW: <[www.dahlhausen.cz](http://www.dahlhausen.cz)>.
- [Obr.4] *Johnson Johnson company* [online]. 2011 [cit. 2011-05-11]. Proceed.  
Dostupné z WWW: <[www.jnjcz.cz](http://www.jnjcz.cz)>.
- [Obr.5] *Oděvy zdravotní* [online]. 2010 [cit. 2011-05-12]. Halena Růžena. Dostupné z WWW: <[www.odevy-zdravotni.cz](http://www.odevy-zdravotni.cz)>.
- [Obr.6] *Ortika a.s.* [online]. 2004-2010 [cit. 2011-05-11]. Ortéza kolenního kloubu .  
Dostupné z WWW: <[www.ortika.cz](http://www.ortika.cz)>.
- [Obr.7] *Pampers* [online]. 2010 [cit. 2011-05-11]. Plenky, plenkové kalhotky.  
Dostupné z WWW: <[www.pampers.cz](http://www.pampers.cz)>.
- [Obr.8] *Simonescu Tissue Engineering and Cell Biology*. [s.l.] : Clemson university, 2010.
- [Obr.9] *Simonescu Tissue Engineering and Cell Biology*. [s.l.] : Clemson university, 2010.
- [Obr. 10] *Simonescu Tissue Engineering and Cell Biology*. [s.l.] : Clemson university, 2010.
- [Obr.11] *Simonescu Tissue Engineering and Cell Biology*. [s.l.] : Clemson university, 2010.
- [Obr.12] *Simonescu Tissue Engineering and Cell Biology*. [s.l.] : Clemson university, 2010.
- [Obr.13] *Simonescu Tissue Engineering and Cell Biology*. [s.l.] : Clemson university, 2010.

[Obr.14] *Simonescu Tissue Engineering and Cell Biology*. [s.l.] : Clemson university, 2010.

[Obr.15] *Potřeby pro laboratoř* [online]. 2007 [cit. 2011-05-13]. Přístroje. Dostupné z WWW: <www.p-lab.cz>.

[Obr.16] *Potřeby pro laboratoř* [online]. 2007 [cit. 2011-05-13]. Přístroje. Dostupné z WWW: <www.p-lab.cz>.

[Obr.17] *Industrial* [online]. 2000-2011 [cit. 2011-05-13]. Products. Dostupné z WWW: <www.beckmancoulter.com>.

[Obr.18] *Potřeby pro laboratoř* [online]. 2007 [cit. 2011-05-13]. Přístroje. Dostupné z WWW: <www.p-lab.cz>.

[Obr.19] *Potřeby pro laboratoř* [online]. 2007 [cit. 2011-05-13]. Přístroje. Dostupné z WWW: <www.p-lab.cz>.

[Obr.20] *Potřeby pro laboratoř* [online]. 2007 [cit. 2011-05-13]. Přístroje. Dostupné z WWW: <www.p-lab.cz>.

[Obr.21] *Trigon plus* [online]. 2007 [cit. 2011-05-13]. Mrazící a chladič boxy. Dostupné z WWW: <www.trigon-plus.cz>.

[Obr.22] *Potřeby pro laboratoř* [online]. 2007 [cit. 2011-05-13]. Přístroje. Dostupné z WWW: <www.p-lab.cz>.

## 9. PŘÍLOHY

### Dotazník

Jak vypadal dotazník v internetovém prohlížeči, stejně tak grafy vycházející z průzkumu je možné shlédnout na přiloženém CD.